

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

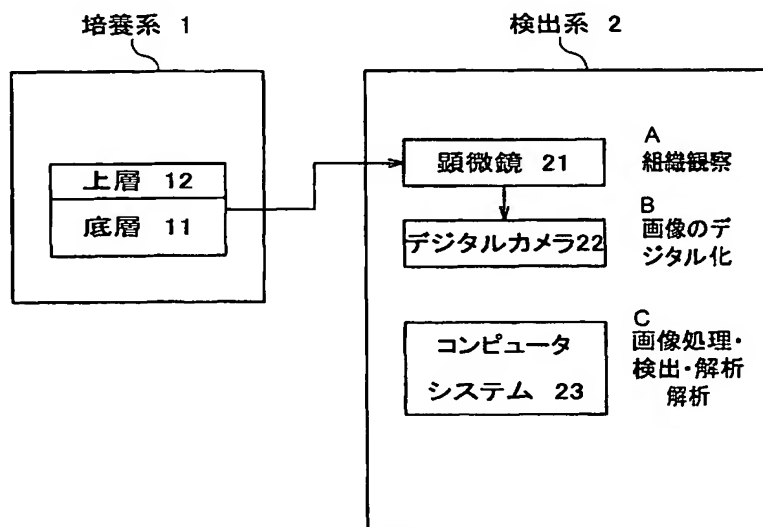
(10) 国際公開番号  
WO 2004/020656 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/04, C12M 1/34, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010865
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 27 日 (27.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-248393 2002 年 8 月 28 日 (28.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ナチュラルウェイ株式会社 (NATURAL WAY CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都 渋谷区 恵比寿 南 2-2 1-2-3 0 2 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および (72) 発明者: 侯 徳興 (KOU,Norioki) [JP/JP]; 〒891-0102 鹿児島県 鹿児島市 星ヶ峯 2 丁目 4 1 番 1 号 Kagoshima (JP). 藤井 信 (FUJII,Makoto) [JP/JP]; 〒891-0102 鹿児島県 鹿児島市 星ヶ峯 2 丁目 9 番 6 号 Kagoshima (JP).
- (74) 代理人: 磯野 道造 (ISONO,Michizo); 〒102-0093 東京都 千代田区 平河町 2 丁目 7 番 4 号 砂防会館別館内 磯野国際特許商標事務所 気付 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: CULTURE SYSTEM, DETECTION AND ANALYSIS SYSTEM AND DETECTION METHOD FOR CANCER CELL COLONIES

(54) 発明の名称: 癌化細胞コロニーの培養系、検出解析システムおよび検出方法



1... CULTURE SYSTEM  
12...TOP LAYER  
11...BOTTOM LAYER  
2... DETECTION SYSTEM  
21...MICROSCOPE  
C... IMAGE PROCESSING, DETECTION AND ANALYSIS, ANALYSIS

A... TISSUE OBSERVATION  
22...DIGITAL CAMERA  
B... IMAGE DIGITALIZATION  
23...COMPUTER SYSTEM

(57) Abstract: It is intended to provide a detection and analysis system for cancer cell colonies, whereby an environmental cell carcinogen causing cell carcinogenesis or a chemical or a food inhibiting cell carcinogenesis can be quickly and accurately detected, and a method therefor. Namely, a detection and analysis system for cancer cell colonies using a culture system (1) prepared by the agar overlaying method which comprises a bottom layer (1) being composed of a culture medium, soft agar and a carcinogenesis inducer and/or an anticancer agent and having a definite size and a top layer (12) being composed of a culture medium, soft agar and cells, and further provided with an optical microscope (21), an electronic data conversion unit (22) such as a digital camera and a computer system (23) for processing the data converted by the electronic data conversion unit (22). This computer system (23) has an image analysis software stored therein whereby the electronic data are grayed, calibrated and binarized by subtraction and single threshold and thus the presence or absence of colonies, the number of colonies, the size distribution of colonies, etc. are analyzed.

[続葉有]



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 細胞癌化を引き起こす環境中の細胞発癌剤、細胞癌化を抑制する薬品や食品を迅速かつ正確に検出することが可能な癌化細胞コロニーの検出解析システムおよびその方法を提供するために、培地と、軟寒天と、発癌誘導物質および/または抗癌剤とから構成される所定の寸法を有する底層11と、培地と、軟寒天と、細胞とから構成される所定の寸法を有する上層12とから構成された寒天重層培養法に基づいて調製された培養系1を用いた、光学顕微鏡21、デジタルカメラ等の電子データ変換手段22および電子データ変換手段22により変換されたデータを処理するためのコンピュータシステム23から構成される癌化細胞コロニーの検出解析システムを本発明は提供する。このコンピュータシステム23には、電子データをグレー化し、キャリブレーション、減算および単一しきい値による2値化を行い、コロニーの有無、コロニーの数、コロニーの寸法分布等を解析する画像解析ソフトウェアが格納されている。

## 明細書

## 癌化細胞コロニーの培養系、検出解析システムおよび検出方法

## 産業上の利用分野

- 5      本発明は、癌化細胞コロニー検出解析システム、癌化細胞コロニー検出方法および、これに用いる癌化細胞コロニーの培養系に関する。より詳しくは軟寒天から構成された軟寒天重層法による培養系と、この培養系を用いた細胞培養及び培養した細胞を半自動化して癌細胞コロニーを検出するシステムと、その方法とに関する。

10

## 背景技術

癌は医療技術のめざましい進歩にもかかわらず、日本においては1981年以来、死亡原因のトップである。したがって、社会の関心は癌の予防に移りつつある。そこで、まず発生過程を知った上で癌の予防を立てなければならない。

- 15      一般に発癌性物質が体に取り込まれて大半は生体の防御能力で代謝し、体外に排泄される。体に溜まった一部は三つの段階を経て最終的に癌という病をもたらす。まず、これらの発癌性物質が短期間（例えば数日間）に細胞遺伝子に障害を与え、変位細胞をもたらす。この変位細胞は、数年から数十年の潜伏期を経て前癌状の細胞となる。最後に前癌状細胞が速いスピード（例えば1年間）で増殖し、  
20      癌となる。このような前癌状の細胞になるまでは我々自身は、何も感じず、現代の医療技術での検出も困難であるので、癌と診断されたら、余命が短いと言われるのがそのわけである。

- 一方、疫学的調査によると、癌の発生の原因の大部分は、私たちの環境、とくに食生活によるものではないかという見方が注目されており、長寿・健康社会に  
25      向けて「食と癌予防」の関連性について、強い関心が寄せられている。

しかしながら、前記したように変位細胞から癌細胞になるためには長い年月がかかるため、癌の予防のためには、この長い過程を持続的に阻害しなければならない。現時点では、食による癌の予防の効果検証は難しく、疫学的調査に頼るしかない。したがって、食材による癌予防の有効な検証方法の開発およびその作用

機構の究明がこれからますます要求されると考えられる。

- 食材による癌予防の有効な検証方法の開発およびその作用機構の究明の一つの  
アプローチとして、Proceedings of the National Academy of Science of the  
United States of America. 98巻、13号、7510～7515頁には、発癌剤  
5 による正常細胞の癌化および癌細胞の進行を、寒天培地でコロニーを形成させて、  
このコロニーの数を計測することで検証する記載がある。

- しかし、先行技術には、寒天培地の濃度および厚さに問題点があり、安定な細胞  
のコロニー数が得られない。また、培養期間は長く、20～30日間を要する。  
さらに、先行技術では、コロニーの検出を顕微鏡下での肉眼観察にて行うため、  
10 コロニーの計数はできるものの、コロニーの大きさおよび分布の解析を行うことは  
できなかった。また、この計数には時間および体力を著しく要し、また、計数  
の結果に実験者の個人差が出やすく、精度に問題があり、この検証方法の課題と  
なっている。また、この検証方法を用いて計数するためには、実験者の熟練を要  
するという課題もあった。
- 15 したがって、本発明は、細胞癌化を引き起こす環境中の細胞発癌剤、細胞癌化  
を抑制する薬品や、食品などを迅速かつ正確に検出することが可能な癌化細胞コ  
ロニーの検出解析システムおよびその方法を提供することを課題とする。

#### 発明の開示

- 20 本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、癌化細胞の培養条件を規格化  
し、この規格に沿って培養された癌化細胞をデジタルデータとしてコンピュータ  
などの演算手段に取り込み、取り込んだデジタルデータを特殊処理することによ  
って、上記課題を解決できることを見出して本発明を創作するに至った。

- 第1の発明は、培地と、0.5%～0.6%の濃度を有する軟寒天と、発癌誘  
25 導物質および抗癌剤から成る群から選択される少なくとも1種の物質とから構成  
される厚さ2.4mmを有する底層と、培地と、0.3%～0.4%の濃度を有  
する軟寒天と、細胞とから構成される厚さ1.6mmを有する上層とから構成さ  
れ、寒天重層培養法に基づいて調製されたことを特徴とする癌化細胞コロニーの  
培養系である。

第1の発明にかかる癌化細胞コロニーの培養系において、底層と上層とが各々所定の構成を有することが重要である。すなわち、培養系を一定条件にすることにより、再現性のある検出および解析結果が得られる。

- さらに、第1の発明において、培養系の上層に含まれる細胞が、マウス新生児皮膚細胞J B 6株であることが好ましい。

- J B 6細胞は、マウスの新生児皮膚の初代培養細胞から樹立された細胞株である。この細胞は非腫瘍性で、発癌プロモーター（TPA、TNF- $\alpha$ 、EGF）のみの処理によって軟寒天コロニー形成能を持っている。また、この細胞はTPAの一段の処理によって、コロニー能を獲得し、プロモートされて前癌状の状態にあるので、発癌プロモーションの検出系、またその作用機構の解析に優れた材料であると考えられている。さらに、本発明の検出系で癌抑制活性を示した多くの化合物は種々の動物実験レベルで、同様な発癌抑制効果が実証されている。したがって、この検出系は発癌プロモーション抑制効果を迅速に検出する手法として現在注目されている系である。
- 第2の発明は、培地と、軟寒天と、発癌誘導物質および抗癌剤から成る群から選択される少なくとも1種の物質とから構成される所定の寸法を有する底層と、培地と、軟寒天と、細胞とから構成された所定の寸法を有する上層とから構成され、寒天重層培養法に基づいて調製された培養系を用いた癌化細胞コロニーの検出解析システムにであって、この培養系により培養された癌化コロニーを観察するための光学顕微鏡と、この光学顕微鏡に映し出されたコロニーの映像を電子データに変換するための電子データ変換手段と、この電子データ変換手段により変換された電子データを処理するためのコンピュータシステムとから構成され、このコンピュータシステムは、この電子データをグレー化し、キャリブレーション、減算及び単一しきい値により2値化を行い、コロニーの有無、コロニーの数、コロニーの寸法分布から成る群から選択された少なくとも1つを解析する画像解析ソフトウェアが格納されていることを特徴としている。

このように構成することによって、細胞癌化を引き起こす環境中の細胞発癌剤また、細胞癌化を抑制する薬品や食品を迅速かつ正確に検出することが可能となる。

第2の発明において、このコンピュータシステムは、既知の発癌誘導物質から得られた標準データによる解析結果を有しており、前記既知の発癌誘導物質の解析結果と、発癌誘導物質および抗がん剤から成る群から選択される少なくとも1種類の物質とを比較することが好ましい。

- 5      このように既知の成分を標準物質として、未知成分の癌化挙動を調べることが容易となる。なお、本発明において使用される用語「癌化挙動」とは、物質が癌抑制作用または誘導作用のいずれかを有していることを意味している。

さらに、第2の発明において、前記既知の発癌誘導物質がTPA、TNF- $\alpha$ 、活性酸素種から成る群から選択されることが好ましい。

- 10      これらの物質の発癌誘導挙動は、公知となっており、標準物質としてこれらの物質と比較することにより、未知の物質の癌誘導または癌抑制挙動を容易に把握することができる。

第3の発明は、本発明の検出解析システムを用いる癌化細胞のコロニーの検出解析方法であって、(A) 発癌作用または抗癌作用を有する物質を選択して前記

15      培養系を調整する段階、(B) 前記培養系において癌化細胞を所定条件で所定時間培養する段階、(C) 前記培養した癌化細胞を、顕微鏡および電子データ変換手段を介して電子画像データとしてコンピュータシステムに送出する段階、

- (D) 前記送出した電子画像データをグレー化し、キャリブレーション、減算および単一しきい値による2値化を行い、コロニーの有無、コロニーの数、コロニーの寸法分布から成る群から選択された少なくとも1つを解析する段階を含むこと
- 20      を特徴とするものである。

このように構成することによって、細胞癌化を引き起こす環境中の細胞発癌剤、または細胞癌化を抑制する薬品や食品等を迅速かつ正確に検出することが可能となる。

- 25      第3の発明の段階(A)において、発癌作用または抗癌作用を有する物質が、食品または食品由来物質であることが好ましい。

食品の抗癌作用および発癌性は、現在最も注目されるものである。本発明は、このような食品や食品由来物質についての癌化挙動を検定することが可能である。

また第3の発明の段階(B)において、培養系の培養条件が約37℃、5%炭

酸ガス中で15～30日であることが好ましい。

このように培養条件を標準化することによって、同一条件で精度よく、かつ再現性のよい検定が可能となる。

- さらに、第3の発明の段階(D)において、このコンピュータシステムで実行
- 5    される画像解析ソフトを用いて解析を行い、寒天ゲルの透明度を均一化し、顕微鏡散乱光を処理し、コロニーの形状、寸法、および数の計測、大きさの分布からなる群から選択されたすくなくとも1つを解析することが好ましく、そして、画像差分処理することにより、ゴミとコロニーの形状を判別し、長径/短径の値が1.6以下を癌化細胞コロニーと判別することが好ましい。
- 10    このような画像解析ソフトを用いることにより、精度よくかつ再現性よく検定を行うことができる。また、画像解析ソフトを用いることで、熟練したスキルを要することなく検定を行うことが可能となる。

#### 図面の簡単な説明

- 15    図1は、本実施例の癌化細胞コロニー検出解析システムの概略を示す模式図である。
- 図2は、本実施例の癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて、培養系の底層にイモジューズ濃縮液を添加した場合を測定した結果を示すグラフである。
- 図3は、本実施例の癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて、培養系の底
- 20    層にブルーベリーアントシアニンを添加した場合を測定した結果を示すグラフである。
- 図4は、本実施例の癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて、培養系の底層に漢方薬の大黄由来のレインを添加した場合を測定した結果を示すグラフである。
- 25    図5は、本実施例の癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて、培養系の底層にアントシアニンに含まれるペオニジン、マルビジン、ペラルゴニン、シヤニン、デルピニンをそれぞれ添加した場合を測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を説明する。

まず、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムの概略を図1に示す。  
この図1を参照して、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムは、所定の寒天重層培養法に基づく培養系1と、前記培養系により培養した癌化細胞を検  
5 出解析するための検出系2とから主として構成される。

(培養系)

本発明において使用される培養系1は、培地と、軟寒天と、発癌誘導物質および抗癌剤から成る群から選択される少なくとも1種の物質とから構成された所定の寸法を有する底層11と、培地と、軟寒天と、細胞とから構成された所定の寸  
10 法を有する上層12とから構成された寒天状重層培養法に基づいて調製された培養系1である。

底層11に用いられる培地は、従来公知のものがから適宜選択されて使用することができ、例えばEMEM (Eagle's minimum essential medium) プラス5%の牛胎児血清を用いることができる。また、底層11における軟寒天培地について  
15 ても、従来公知のものを使用することができるが、再現性の観点から、同一メーカーのものを使用することが特に好ましい。本発明において、底層11を形成する軟寒天は、例えば濃度0.5~0.6%、好ましくは0.5パーセントの一定量に規定する。また、厚みについても一定の厚み例えば2.4mmに規定する。このようにして構成された底層11に、所定量の発癌誘導剤または抗癌剤を添加し  
20 て本発明の培養系1における底層11を調整する。

なお、上層12および底層11の寒天ゲルの濃度と厚みは、顕微鏡撮影のため、ある程度の透明度を有する寒天ゲルである必要であり、そのために寒天ゲルの濃度と厚みを検討し、細胞培養に影響が無く、さらに顕微鏡撮影もできる寒天ゲルの濃度と厚みを選択するものである。

25 この際に使用される発癌誘導剤として、発癌性が充分確立されている既知の発癌誘導剤、例えばTPA、TNF- $\alpha$ 、活性酸素種、発癌性が未知の発癌性の物質を添加する。後述する通り、既知の発癌性誘導剤を添加して所定条件で調製した本発明の培養系1を用いて培養を行い検出解析したデータを、標準データとして用いて、この標準データと、検出解析すべき未知成分を同量添加して比



較することにより未知成分の発癌性を解析することが可能となる。

また、同様にして、抗癌剤、例えば種々の医薬用抗癌剤や食品などを底層 1 1 に添加することも可能である。さらに、例えば発癌誘導剤と抗癌剤の両方を底層 1 1 に添付してその抗癌剤の抗癌作用を解析することも可能である。

- 5 本発明の培養系 1 における上層 1 2 は、所定の寸法および所定濃度の軟寒天および癌細胞を成長させるための細胞から構成される。

上層 1 2 に使用される軟寒天は、例えば濃度 0. 3 ~ 0. 4 % および厚み 1. 6 mm などの所定条件に設定することが必要である。

- 10 本発明に使用する細胞は、特に制限されるものではないが、J B 6 細胞が好ましい。

- J B 6 細胞は、マウス新生児皮膚の初代培養細胞から樹立された公知の細胞株である。(N.H. Colburn et al., Nature, 281, 589 (1979))。この細胞は非腫瘍性で、発癌プロモーター (T P A、T N F- $\alpha$ 、E G F) のみの処理によって、軟寒天コロニー構成能を有している。また、この細胞は T P A の一段の処理  
15 によって、コロニー能を獲得し、プロモートされて前癌状態にあるので、発癌プロモーションの検出用、またはその作用機構の解析用に優れた材料だと考えられている (Z. Dong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 609 (1994); Z. Dong et al., Mol Carcinog., 19, 204 (1997); J. J. Li et al., Cancer Res., 57, 3569 (1997); C. Huang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 156 (1998); および J. Y. Chung et al.  
20 ., Cancer Res., 59, 4610 (1999) を参照のこと)。また、後述する本発明と同様の検出系で癌抑制活性を示した多くの化合物は種々の動物実験レベルで、同様な発癌抑制効果が実証されている (M. R. Young et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9827 (1999); および Y. Zhao et al., Cancer Res., 61, 6082 (2001) を参照のこと)。  
したがって、この J B 6 細胞を用いた検出方法は、発癌プロモーション抑制効果  
25 を迅速に検出する方法として現在注目されている系である。本発明ではこのような細胞を用いることで、多大な時間および労力を要することなしに、実験者による測定誤差を最小化して使用することが可能である。

本発明において、このように構成された軟寒天をシャーレ上で所定温度、例えば 4 2 °C で溶解して培養系 1 を形成する。

このようにして調製された培養系 1 は、所定条件で培養される。この培養系 1 の培養条件を規定することにより、短時間で癌細胞の組織培養を安定して行うことが可能となり、再現性のある検出解析結果が得られる。

例えば、本発明では培養条件として、約 37℃ の温度にて、5% 炭酸ガス中 15  
5 5～30 日、好ましくは 15 日間インキュベータ中で培養することにより再現性のある検出解析を行うことが可能である。

(検出系)

本発明の癌化細胞コロニー検出解析システムにおける検出系 2 は、顕微鏡 21、この顕微鏡 21 に接続された電子データ変換手段であるデジタルカメラ 22 およ  
10 びコンピュータシステム 23 から主に構成される。

本発明において使用される顕微鏡 21 は、従来公知の倍率を有する光学顕微鏡であって、デジタルカメラ 22 などの電子データ変換手段と接続可能なものであれば特に制限されるものではない。

デジタルカメラ 22 は、顕微鏡 21 で拡大したアナログ画像を、電子データであるデジタル画像データ、例えば J P E G、T I F F、P C X、G I F フォーマットなどのデジタル画像データに変換する電子データ変換手段である。デジタル  
15 カメラ 22 によって、デジタル画像データは、デジタルカメラ 22 に内蔵された記憶媒体に保存され、この記録媒体を介してコンピュータシステム 23 に取り込むことが可能であるが、例えば U S B (Universal Serial Bus) などのインターフェイスを介して直接コンピュータシステム 23 に送出することがさらに望ましい。  
20

本発明の検出系 2 に使用されるコンピュータシステム 23 は、ストレージ、ストレージに保持されたプログラムを実行するための演算処理装置 (Central Processing Unit)、R A M (Random Access Memory)、デジタルカメラ 22 で  
25 撮影されたデジタル画像データを取り込むためのインターフェイス、例えば U S B インターフェイスや、メモリーカードリーダーなどのデジタルカメラ 22 に内蔵された記録媒体の取り込み手段などから主に構成されている。このコンピュータシステム 23 のストレージには、オペレーティングシステム、画像解析ソフトウェアなどのプログラムと、デジタル画像データなどが保持されている。

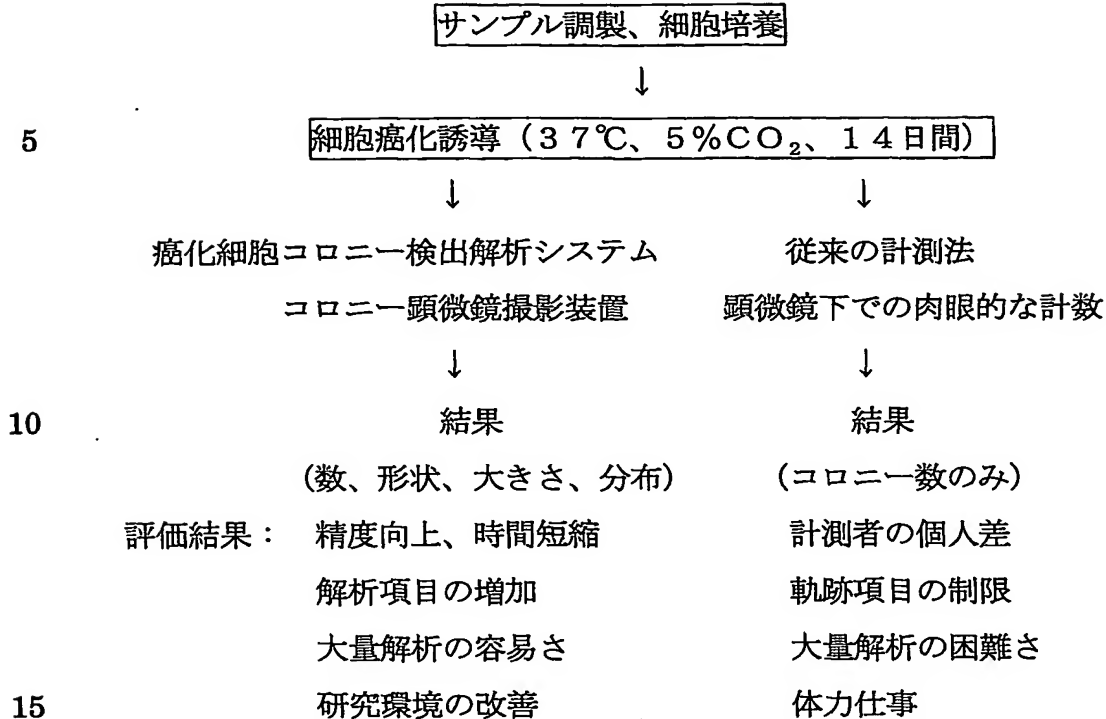
本発明において、デジタルカメラ 22 から取り込まれる培養結果であるデジタル画像データは、画像解析ソフトウェアにより解析される。この画像解析ソフトウェアは、例えば、デジタル画像データをグレースケール化し、キャリブレーション、減算および単一しきい値による 2 値化を行い、コロニーの有無、コロニーの数および/またはコロニーの寸法分布を解析することが可能である。この際に、顕微鏡撮影の目的で、寒天ゲルの透明度を均一化し、顕微鏡散乱光を処理するのが好ましく、さらに、当該技術分野に公知の方法による画像差分処理することで、ゴミと癌化細胞コロニーの形状を判別させることが望ましい。この際、細胞癌化コロニーは、一般的に円状であるので、癌化細胞コロニーの判定条件を長径/短径の値が 1.6 以下とすると、長細のゴミなどを除去して解析することができる。

なお、顕微鏡撮影では、必然的に中心部の光量が多く、その周辺につれて暗い視野となってしまう。そのため、光量の分布の影響を補正するため、画像差分処理を行う。その方法としては、細胞を入れていない寒天ゲルのシャーレを撮影し、このデジタル画像データをコントロール画像とする。検出解析対象のサンプル画像からこのコントロール画像を除くと明るさが均一化されたサンプル画像が得られる。

このように構成することによって、培養系 1 で所定条件により培養された細胞の検出および解析を効率よくかつ再現性よく行うことができる。

次に、本発明の癌化細胞コロニー検出解析システムを用いた場合と従来のシステムを用いた場合の検出解析の相違を列挙する。

## 従来のシステムと本発明に係るシステムの相違



## 実施例

次に、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて、抗癌作用を  
 20 有する食品由来物質を、培養系1の底層11に添付して培養し、癌化細胞コロニーを検出解析した結果を以下の実施例に示す。

## (実施例1)

実施例1では、底層11の寒天にイモジューズ濃縮液とTPAとを添加して培養系1を調製した。この培養系1を所定条件で培養し、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて検出解析した結果を図2に示す。図2に示した  
 25 グラフは、縦軸に癌化抑制率を、横軸にイモジューズの濃度をとって、イモジューズの各濃度における、癌化抑制率をプロットしたものである。

図2に示したグラフによると、イモジューズの濃度の増加とともに癌化抑制率が向上することがわかる。

(実施例 2)

実施例 2 では、底層 1 1 の寒天にブルーベリーに含まれるブルーベリーアントシアニンを添加して培養系 1 を調製した。この培養系 1 を所定条件で培養し、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて検出解析した結果を図 3  
5 に示す。図 3 に示したグラフは、図 2 に示したグラフと同様に、縦軸に癌化抑制率を、横軸にブルーベリーアントシアニンの濃度をとって、ブルーベリーアントシアニンの各濃度における、癌化抑制率をプロットしたものである。

このグラフによると、ブルーベリーアントシアニンの濃度の増加とともに癌化抑制率が向上することがわかる。

10 (実施例 3)

実施例 3 では、底層 1 1 の寒天に漢方薬の大黃由来のレインを添加して培養系 1 を調製した。この培養系 1 を所定条件で培養し、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて検出解析した結果を図 4 に示す。図 4 に示したグラフは、図 2 に示したグラフと同様に、縦軸に癌化抑制率を、横軸にレインの濃度  
15 をとって、レインの各濃度における、癌化抑制率をプロットしたものである。

このグラフによると、大黃由来のレインの濃度の増加とともに癌化抑制率が向上することがわかる。

(実施例 4)

実施例 4 では、底層 1 1 の寒天にアントシアニンに含まれるペオニディン、  
20 マルビジン、ペラルゴニン、シヤニン、デルピニジンをそれぞれ添加して、それぞれ培養系 1 を調製した。それぞれの培養系 1 を所定条件で培養し、本発明に係る癌化細胞コロニー検出解析システムを用いて検出解析した結果を図 5 に示す。図 5 に示したグラフは、図 2 に示したグラフと同様に、縦軸に癌化抑制率を、横軸にアントシアニン由来の各成分の濃度をとって、各成分の各濃度における、  
25 癌化抑制率をプロットしたものである。

このグラフによると、全体として各成分の濃度の増加とともに癌化抑制率が向上することがわかる。中でも特にデルピニジンの細胞癌化抑制効果が高いことがわかる。

以上、実施例 1 ないし実施例 4 に示す通り、本発明の培養系およびシステムを

用いることで、癌細胞の抑制率を定量的に測定できることがわかる。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明によると、細胞癌化を引き起こす環境中の細胞発癌剤、細胞癌化を抑制
- 5 する薬品や食品を、迅速かつ正確に検出することができ、長寿・健康社会に向けて、食材による癌の予防の有効な検証手段を提供することができる。

## 請求の範囲

1. 培地と、0.5%~0.6%の濃度を有する軟寒天と、発癌誘導物質および抗癌剤から成る群から選択される少なくとも1種の物質とから構成される2.4 mmの厚さを有する底層と、
- 5 培地と、0.3%~0.4%の濃度を有する軟寒天と、細胞とから構成される1.6 mmの厚さを有する上層とから構成され、寒天重層培養法に基づいて調製されたことを特徴とする癌化細胞コロニーの培養系。
  2. 前記上層に含まれる細胞は、マウス新生児皮膚細胞J B 6株であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の癌化細胞コロニーの培養系。
- 10 3. 培地と、軟寒天と、発癌誘導物質および抗癌剤から成る群から選択される少なくとも1種の物質とから構成される所定の寸法を有する底層と、  
培地と、軟寒天と、細胞とから構成された所定の寸法を有する上層とから構成され、寒天重層培養法に基づいて調製された培養系を用いた癌化細胞コロニーの検出解析システムであって、
- 15 前記培養系により培養された癌化コロニーを観察するための光学顕微鏡と、  
前記光学顕微鏡に映し出されたコロニーの映像を電子データに変換するための電子データ変換手段と、  
前記電子データを処理するためのコンピュータシステムとから構成され、  
前記コンピュータシステムは、前記電子データをグレー化し、キャリブレーション、減算及び単一しきい値により2値化を行い、コロニーの有無、コロニーの数、コロニーの寸法分布から成る群から選択された少なくとも1つを解析する画像解析ソフトウェアが格納されていることを特徴とする癌化細胞コロニーの検出解析システム。
- 20 4. 前記コンピュータシステムは、既知の発癌誘導物質の解析結果と発癌誘導物質および抗癌剤から成る群から選択される少なくとも1種の物質の解析結果とを比較することを特徴とする請求の範囲第3項に記載の癌化細胞コロニーの検出解析システム。
- 25 5. 前記既知の発癌誘導物質は、TPA、TFA-アルファ、活性酸素種からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第4項に記載の癌化細胞コ

ロニーの検出解析システム。

6. 請求の範囲第4項ないし第6項のいずれか1項に記載の検出解析システムを用いる癌化細胞コロニーの検出解析方法であって、

(A) 発癌作用または抗癌作用を有する物質を選択して前記培養系を調製する

5 段階、

(B) 前記培養系において癌化細胞を所定条件で所定時間培養する段階、

(C) 前記培養した癌化細胞を、顕微鏡および電子データ変換手段を介して電子画像データとしてコンピュータシステムに送出する段階、

10 (D) 前記送出した電子画像データをグレー化し、キャリブレーション、減算および単一しきい値による2値化を行い、コロニーの有無、コロニーの数、コロニーの寸法から成る群から選択された少なくとも1つを解析する段階を含むことを特徴とする癌化細胞コロニーの検出解析方法。

7. 前記段階(A)において、前記発癌作用または抗癌作用を有する物質は、食品または食品由来物質であることを特徴とする請求の範囲第6項に記載の癌化細胞コロニーの検出解析方法。

8. 前記段階(B)において、前記培養系の培養条件は、約37℃、5%炭酸ガス中で15～30日であることを特徴とする請求の範囲第6項に記載の癌化細胞コロニーの検出解析方法。

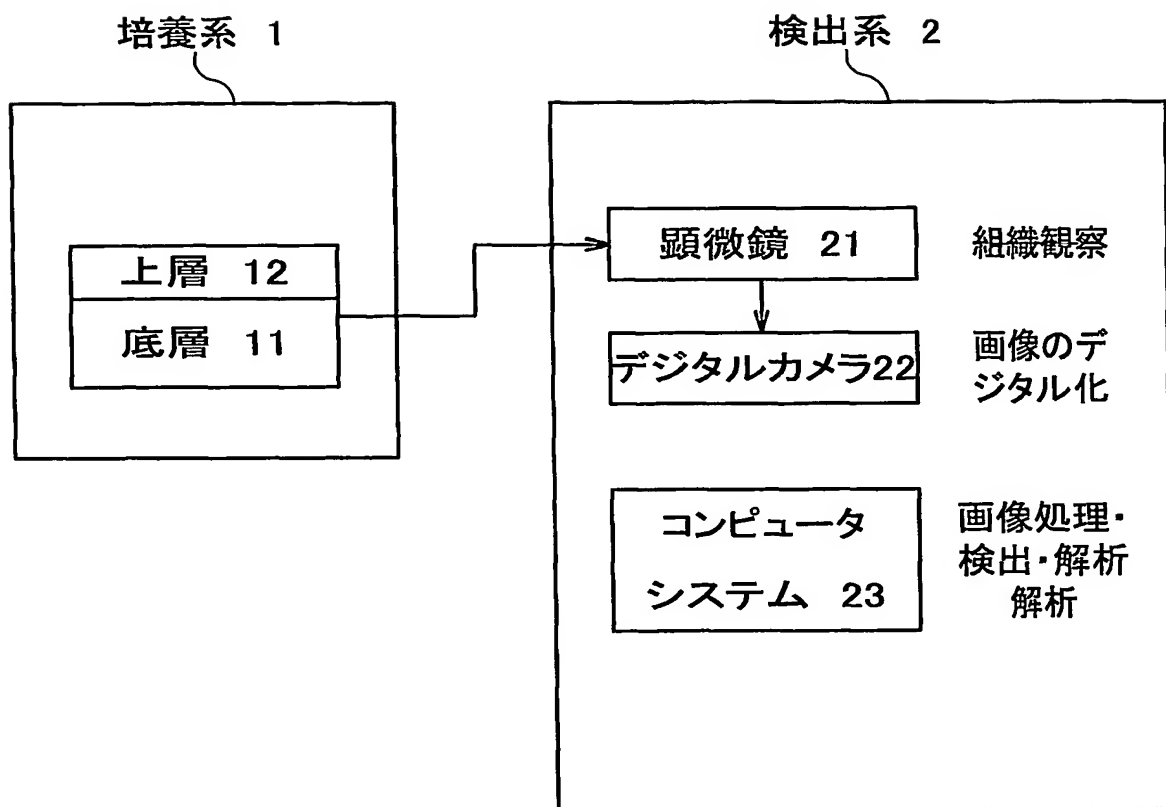
9. 前記段階(D)において、前記解析は、前記コンピュータシステムで実行される画像解析ソフトウェアにより行われ、寒天ゲルの透明度を均一化し、顕微鏡散乱光を処理し、コロニーの形状、寸法および数の計測、大きさの分布からなる群から選択された少なくとも1つを解析することを特徴とする請求の範囲第6項に記載の癌化細胞コロニーの検出解析方法。

10. 前記段階(D)において、前記解析は、画像差分処理することにより、ゴミと癌化細胞コロニーの形状を判別し、長径/短径の値が1.6以下を癌化細胞コロニーと判別することを特徴とする請求の範囲第9項に記載の癌化細胞コロニーの検出解析方法。



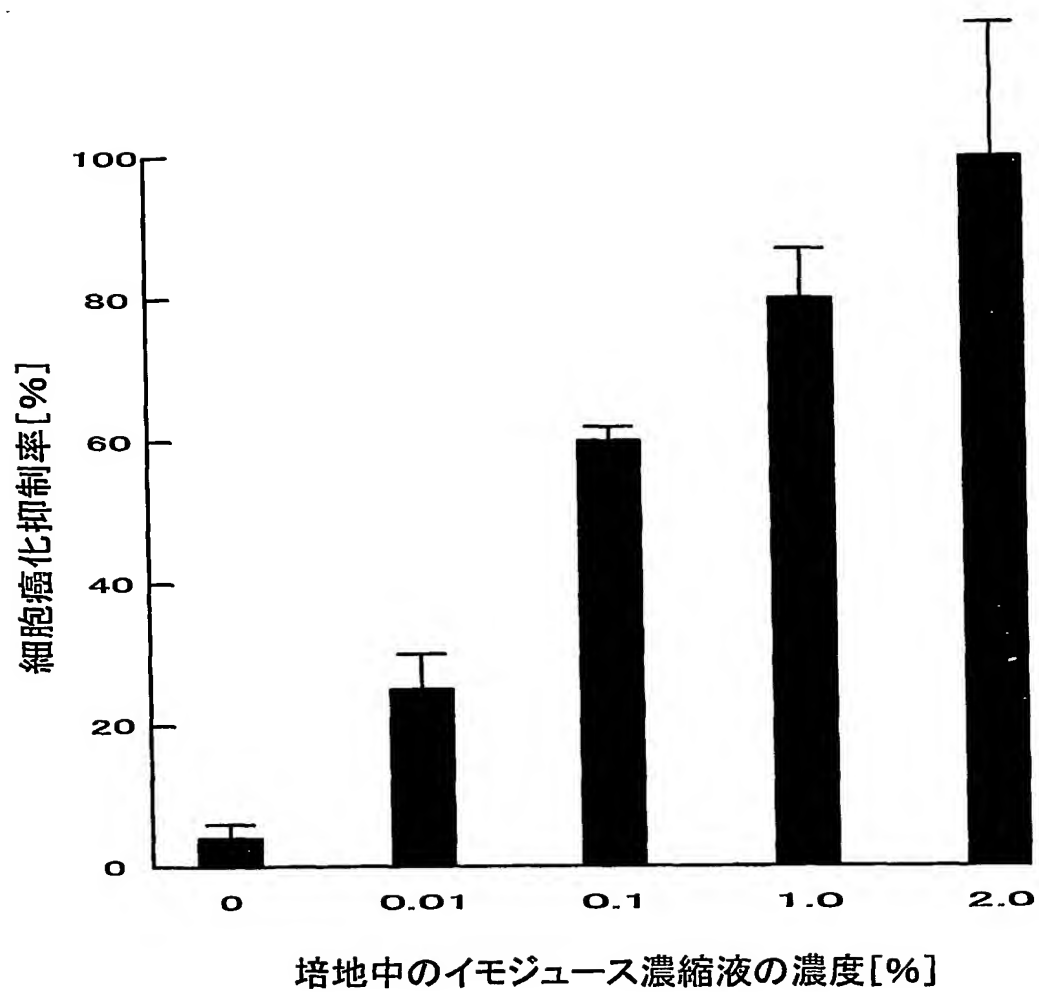
1/5

図1



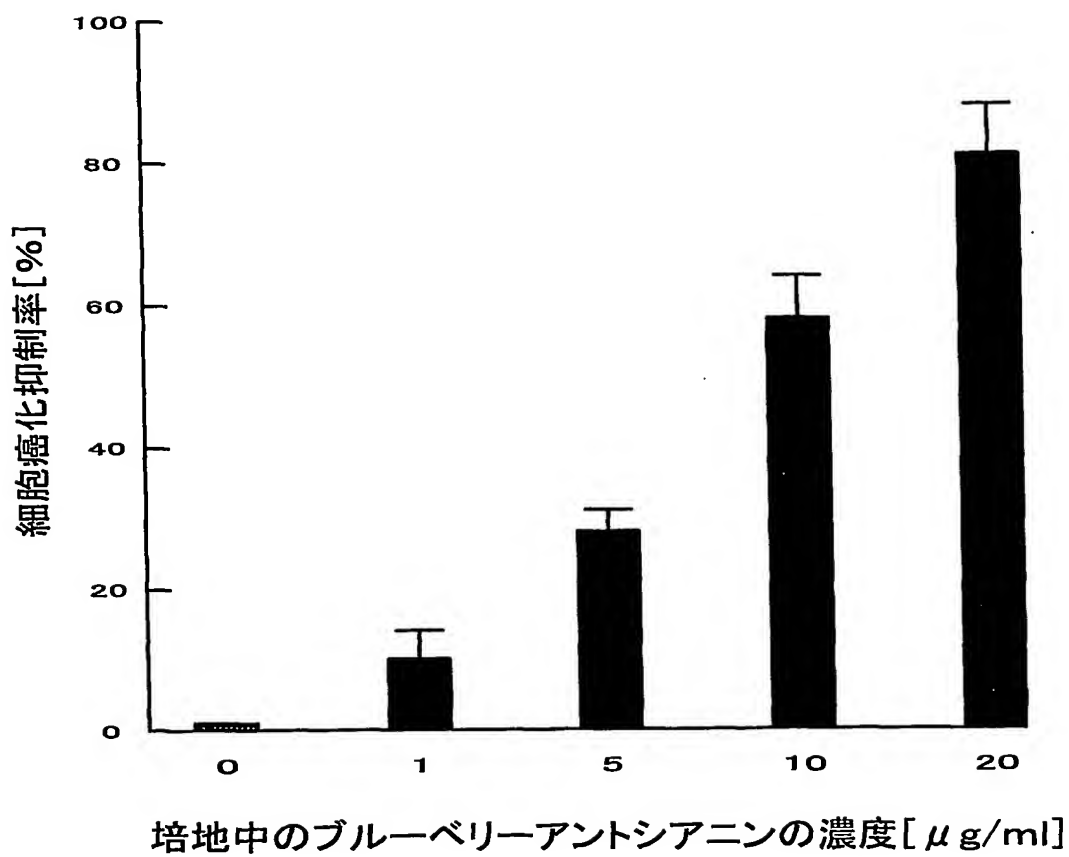
2/5

図2



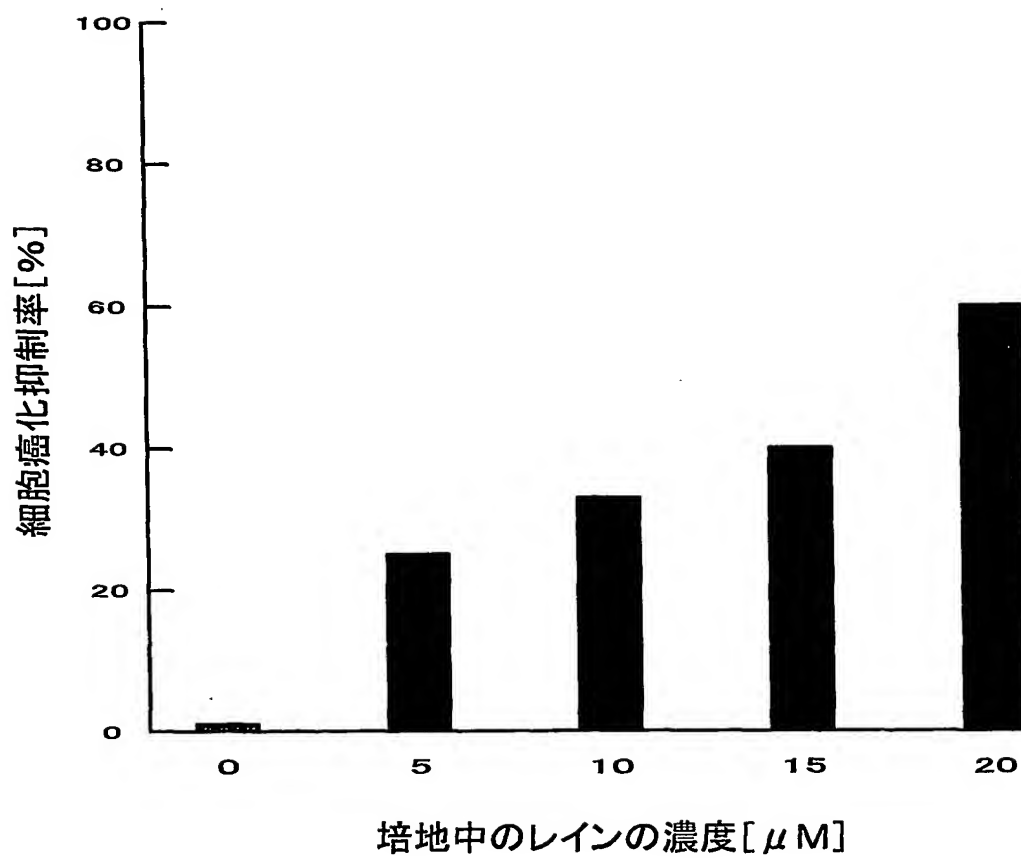
3/5

図3



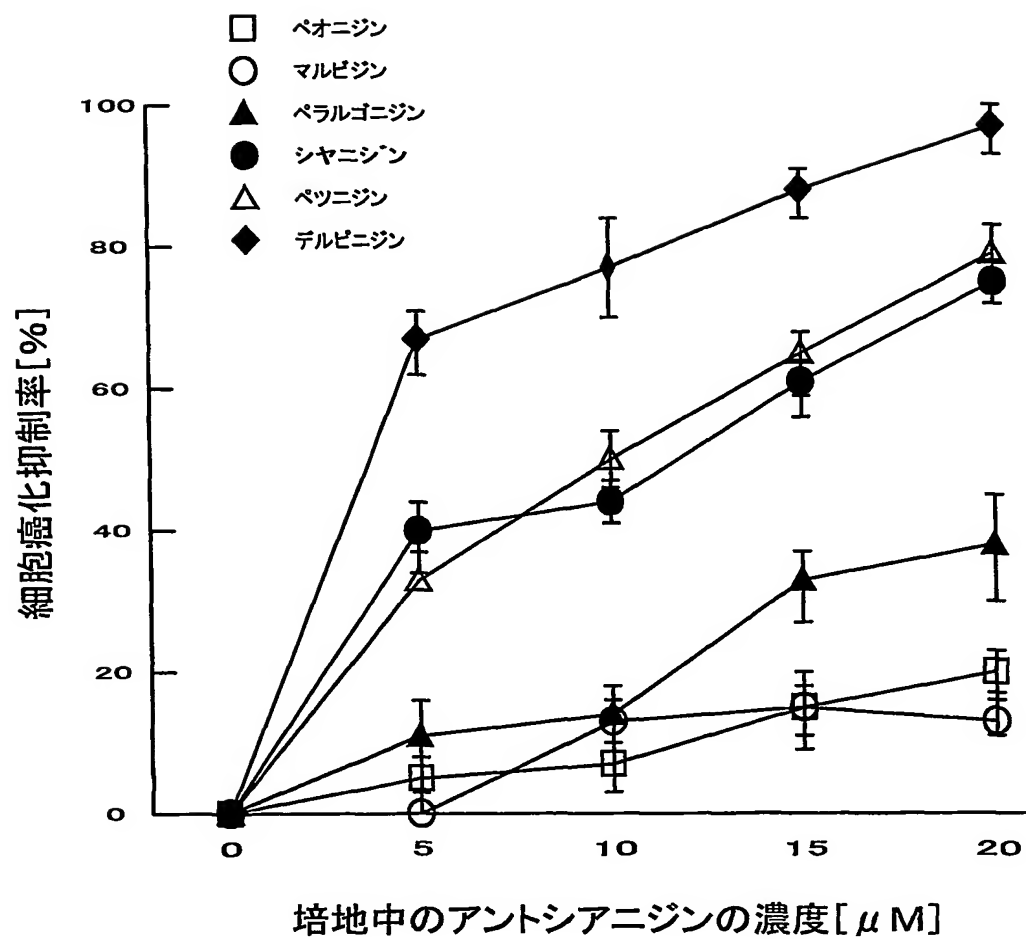
4/5

図4



5/5

図5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10865

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/04, C12M1/34, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/04, C12M1/34, G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	JP 2003-265195 A (Ko Tokuko), 24 September, 2003 (24.09.03), Claims; examples (Family: none)	1-10
Y	Anne W., Hamburger et al., "Effect of Epidermal Growth Factor on Proliferation of Human Tumor Cells in Soft Agar", Journal of the National Cancer Institute, 1981, Vol.67, pages 825 to 830, Full text	1-10
Y	Zigang Dong et al., "Differential transformation efficiency but not AP-1 induction under anchorage- dependent and-independent conditions", Carcino genesis, 1994, Vol.15(5), pages 1001 to 1004, Full text	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
26 November, 2003 (26.11.03)

Date of mailing of the international search report  
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## PCT/JP03/10865

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/04, C12M1/34, G01N33/15, 33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/04, C12M1/34, G01N33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, X	JP 2003-265195 A, (侯徳興) 2003. 09. 24, 特許請求の範囲、実施例等参照, (ファミリーなし)	1-10
Y	Anne W. Hamburger et al. "Effect of Epidermal Growth Factor on Proliferation of Human Tumor Cells in Soft Agar" Journal of the National Cancer Institute, 1981, Vol. 67, p. 825-830, 文献全体参照	1-10
Y	Zigang Dong et al. "Differential transformation efficiency but not AP-1 induction under anchorage-dependent and -independent conditions" Carcinogenesis, 1994, Vol. 15(5), p. 1001-1004, 文献全体参照	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Chuanshu Huang et al. "Shortage of mitogen-activated protein kinase is responsible for resistance to AP-1 transactivation and transformation in mouse JB6 cells" Proceeding of the National Academy of Sciences, USA, 1998, Vol. 95(1), p. 156-161, 文献全体参照	1-10
Y	EP 447034 A1, (NITTA GELATIN INC.) 1991. 09. 18. 特許請求の範囲、実施例等参照, & JP 3-285696 A & US 5356793 A & DE 69131722 A	1-10